Die chemische und biologische Bestimmung der Mutterkornalkaloide

Dissertation

von

Richard Schindler

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die chemische und biologische Bestimmung der Mutterkornalkaloide

Inauguraldissertation

der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde,
vorgelegt von

Richard Schindler
von Röthenbach i. E.

Von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag von
Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen

Bern, den 16. Februar 1956.

Der Dekan:
sig. Prof. Dr. W. Feitknecht

Gekürzte, von der Fakultät genehmigte Fassung.
Mikrofilmkopien der ungekürzten Dissertation sind von der
Stadt- und Hochschulbibliothek erhältlich.

Buchdruckerei Paul Haupt, Bern 1956

Die vorliegende Arbeit wurde am pharmakologischen Institut der Universität Bern unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. W. Wildbrandt,
Herrn Prof. Dr. A. Bürgin und
Herrn Prof. Dr. R. Signer

ausgeführt. Ihnen möchte ich für das Interesse, welches sie meiner Arbeit entgegengebracht haben, sowie für ihre wohlwollende Unterstützung meinen herzlichsten Dank aussprechen.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung ... 1

I. Chemische Eigenschaften der Mutterkornalkaloide ... 1
1. Wasserlösliche Gruppe ... 2
2. Wasserunlösliche Gruppe ... 3

II. Pharmakologische Eigenschaften der Mutterkornalkaloide ... 5

III. Die Charakteristica der chemischen und pharmakologischen Bestimmung 6
1. Die chemische Bestimmung ... 7
2. Die pharmakologische Bestimmung ... 8

IV. Übersicht über die Literatur betreffend die chemische Trennung und Bestimmung der natürlichen Mutterkornalkaloide ... 8
1. Trennung ... 8
2. Quantitative Bestimmung ... 10

V. Übersicht über die Literatur betreffend pharmakologische Bestimmung der Mutterkornalkaloide ... 11
1. Bestimmung der sympatholytischen Wirksamkeit ... 11
2. Bestimmung der Uteruswirksamkeit ... 12
3. Weitere biologische Bestimmungsmethoden ... 14

B. Eigene Versuche zur chemischen Trennung und Bestimmung ... 15

I. Methodik bei den papierchromatographischen Versuchen ... 15
1. Die Behandlung und Verwendung der Reinalkaloide ... 15
2. Die Papierchromatographie ... 16
3. Das Trocknen der Chromatogramme ... 17
4. Das Anfärben der Alkaloide auf dem Papier ... 17
5. Die rechnerische und graphische Auswertung ... 17

II. Die praktische Ausführung der wichtigsten in der Literatur beschriebenen Chromatographie-Methoden und ihre Beurteilung ... 18
1. Die Methode Brindle, Carless und Woodhead ... 18
2. Die Methode Tyler und Schwarting ... 19
3. Die Methode Macek, Cerny und Semonsky ... 20
4. Die Methode Pöhm und Fuchs ... 21
5. Die Methode Stoll und Rüegger ... 21
6. Zusammenfassung zu den reproduzierten Chromatographiemethoden aus der Literatur ... 24

Seite

III. Chromatographische Untersuchungen über die Löslichkeit der Mutterkornalkaloide in verschiedenen Lösungsmitteln ... 26

IV. Die Beeinflussung der Trennfaktoren durch das die mobile Phase darstellende Lösungsmittel und durch den pH-Wert des gepufferten Papiers ... 29

V. Versuche zur Trennung der Ergotaminin- von der Ergotoxingruppe mit Phthalsäuredimethylester als stabiler Phase ... 33

1. Phthalsäuredimethylester auf unbehandeltem Papier als stabile Phase 34
   a) Mobile Phase: Wasser ... 34
   b) Mobile Phase: Ameisensäure-Wasser ... 34
   c) Mobile Phase: Methanol-Wasser ... 34
   d) Mobile Phase: Acetonitril-Wasser ... 34
2. Phthalsäuredimethylester auf silikoniertem Papier als stabile Phase ... 35
   a) Mobile Phase: Acetonitril-Wasser ... 35
   b) Mobile Phase: Ameisensäure-Wasser ... 35

VI. Versuche zur Trennung der Ergotaminin- von der Ergotoxingruppe mit Formamid als stabiler Phase (1. Dim.) und zur Umkehrung der Phasen in der Methode Stoll-Rüegger (2. Dim.) ... 36

1. Versuche zur Trennung in der 1. Dimension ... 36
   a) Mobile Phase: Benzol ... 36
   b) Mobile Phase: Chloroform ... 36
   c) Mobile Phase: Benzol-Chloroform 3 : 1 ... 37
   d) Mobile Phase: Essigsäureäthylester ... 37
      Methyläthylketon ... 37
      Acetessigester ... 37
   e) Mobile Phase: Methyläthylketon-Chloroform 1 : 1 ... 39
   f) Mobile Phase: Dichloressigsäuremethylester ... 39
   g) Mobile Phase: Dichloressigsäuremethylester-Benzol ... 39
2. Versuche zur Trennung in der 2. Dimension ... 40
   a) Mobile Phase: Phthalsäuredimethylester ... 40
   b) Mobile Phase: Phthalsäuredimethylester in Mischung mit einem weiteren Lösungsmittel ... 40
3. Zusammenfassung zu Abschnitt VI ... 41

VII. Versuche zur Trennung der Ergotaminin- von der Ergotoxingruppe mit einer leichtflüchtigen mobilen und stabilen Phase, welche eine anschließende Chromatographie nach Stoll-Rüegger ermöglichen ... 41

1. Verwendung von Flüssigkeiten mittlerer Flüchtigkeit (Kp. bis 200 °) als stabile Phase ... 41
   a) Stabile Phase: Glykol ... 41
   b) Stabile Phase: Propylenglykol ... 42
   c) Stabile Phase: Methylurethan ... 42
   d) Stabile Phase: Formaldehydcyanhydrin ... 42

Seite

2. Der Anschluß der Methode Stoll-Rüegger in der 2. Dimension nach Imprägnierung des Papiers mit Formaldehydcyanhydrin 43
3. Verwendung von Flüssigkeiten relativ hoher Flüchtigkeit (Kp. etwa 100 °) als stabile Phase in der 1. Dimension 44
a) Das Verhältnis Ameisensäure-Wasser in der stabilen Phase 45
b) Gehalt des Papiers an stabiler Phase 45
c) Zusammensetzung der mobilen Phase 45
d) Zusatz von Ameisensäure zur mobilen Phase 45
e) Verwendung von silikoniertem Papier 46
4. Der Übergang zur 2. Dimension nach Chromatographie auf dem mit Ameisensäure imprägnierten Papier 46
5. Die Chromatographie in der 2. Dimension: Versuche zur Vervollkommnung der Methode Stoll-Rüegger 48
a) Durchführung der Chromatographie nach Stoll-Rüegger bei 2 °C ... 48
b) Durchführung der Chromatographie nach Stoll-Rüegger auf silikoniertem Papier 48
c) Der Einfluß des Gehalts des Papiers an Phthalsäuredimethylester .. 49
d) Der Einfluß der Qualität des für die mobile Phase verwendeten Formamids 49

VIII. Zusammenfassung zu den Untersuchungen über die papierchromatographischen Trennungsmöglichkeiten der Mutterkornalkaloide: die entwickelte zweidimensionale Trennmethode 49

1. Vorbehandlung des Papiers 49
2. Die Chromatographie in der 1. Dimension 50
3. Die Chromatographie in der 2. Dimension 51
4. Das Trocknen und Färben der Chromatogramme zur qualitativen Beurteilung 52
5. Die R_f-Werte im zweidimensionalen Chromatogramm 53

IX. Die Anwendung der zweidimensionalen Papierchromatographiemethode auf die qualitative Analyse von natürlichen Extrakten und von Arzneimitteln .. 55

1. Analyse von Extr. sec. corn. mit 25 % Alkaloidgehalt 55
2. Analyse von Bellergal 56

X. Die quantitative Bestimmung der papierchromatographisch getrennten Alkaloide 57

1. Methodik 57
a) Das Aufsetzen einer bekannten Alkaloidmenge auf den Startpunkt des Chromatogramms 57
b) Die Erkennung der chromatographisch getrennten Alkaloide auf dem Papier 57
c) Die Farbreaktion 57
d) Die Messung der Extinktion der Farblösung 58

Seite

2. Vorversuche ... 58
a) Ist das Trocknen der Chromatogramme vor der Ausführung der Farbreaktion vorteilhaft? ... 58
b) Vergleich des p-Dimethylaminobenzaldehyds mit Metaldehyd als Farbreagens ... 58
c) Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes ... 59
d) Die zeitliche Abhängigkeit der Extinktion ... 61
3. Die Genauigkeit der kolorimetrischen Bestimmung ... 61
4. Die quantitative Prüfung der zweidimensionalen papierchromatographischen Methode ... 62
a) Die Ausbeute nach Chromatographie in der 1. Dimension ... 62
b) Die Ausbeute nach zweidimensionaler Chromatographie ... 62
c) Zusammenfassung zur quantitativen Papierchromatographie ... 63

C. Eigene Versuche zur biologischen Bestimmung ... 64

I. Die Bestimmung der Uteruswirksamkeit ... 64

1. Die Aufgabestellung ... 64
2. Allgemeines zur Methodik ... 65
a) Die Registrierung der Längenänderungen ... 66
b) Die Registrierung der Volumenänderungen ... 67
c) Die isometrische Druckregistrierung ... 68
d) Weitere experimentelle Einzelheiten ... 69
3. Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten ... 70
a) Ratte ... 70
b) Goldhamster ... 71
c) Maus ... 71
d) Kaninchen ... 72
e) Meerschweinchen ... 72
4. Der hormonale Zustand des Versuchstiers (Meerschweinchen) ... 73
5. Die verwendeten Uterusteile ... 75
6. Vergleich der Längen- mit der Volumenregistrierung ... 76
7. Die Aufbewahrung des isolierten Uterus in Tyrode-Lösung von 3 °C vor dessen Verwendung als Testobjekt ... 78
8. Die Badtemperatur ... 80
9. Versuche, die Rhythmik pharmakologisch auszuschalten ... 80
10. Die aus den Versuchen entwickelte Testmethode ... 81
a) Das experimentelle Vorgehen ... 82
b) Die Auswertung der Kymogramme ... 84
11. Die Prüfung der beschriebenen Methode ... 86
a) Der mittlere Fehler ... 86

Seite

b) Unbrauchbare Kreuzversuche ... 87
c) Die Wirkung der verschiedenen Mutterkornalkaloide ... 87
d) Die Wirkung von weiteren, in Mutterkornextrakten vorkommenden Wirkstoffen ... 89
12. Zusammenfassung zu Abschnitt I ... 89

II. Die Bestimmung der sympatholytischen Wirksamkeit ... 90

1. Die allgemeine Problemstellung ... 90
2. Theorie zur Verdrängungskinetik ... 91
3. Spezielle Fragestellungen ... 92
4. Die experimentelle Prüfung der gestellten Fragen ... 92
a) Allgemeines zur Methodik ... 92
b) Die Adrenalin-Dosiswirkungskurve ... 93
c) Versuche zur Herabsetzung der Adrenalin-Rhythmik und der Spontanrhythmik ... 95
α) Aufbewahrung der Samenblase in Tyrode-Lösung von 3 °C vor dem Versuch ... 95
β) Senken der Badtemperatur ... 95
γ) Verwendung modifizierter Badflüssigkeiten ... 97
δ) Versuche zur pharmakologischen Beeinflussung der Rhythmik ... 97
ε) Volumenregistrierung ... 98
d) Die Parallelverschiebung der Dosiswirkungskurve durch Ergotamin 98
e) Das Ausmaß der Verschiebung der Dosiswirkungskurve in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration ... 101
5. Die aus den Versuchen entwickelte Testmethode ... 104
a) Das experimentelle Vorgehen ... 104
b) Die Auswertung ... 106
6. Die Ergebnisse der Fehlerbestimmungen ... 108
a) Der mittlere Fehler bei gleicher Wirksamkeit von Test und Standard 108
b) Der mittlere Fehler beim Wirksamkeitsverhältnis 3 : 1 ... 109
7. Deutungsversuche für die gefundenen Abweichungen von der einfachen Verdrängungskinetik ... 109
a) Die Geschwindigkeiten der Gleichgewichtseinstellungen am Rezeptor 109
b) Andere Verdrängungsschemata ... 111
α) Das Reaktionsschema ... 111
$R + A \rightleftarrows RA$, $RA + A \rightleftarrows RA_2$, $R + E \rightleftarrows RE$;
Wirkungsbestimmend: (RA_2)
β) Das Reaktionsschema ... 112
$R + A \rightleftarrows RA$, $RA + A \rightleftarrows RA_2$, $R + E \rightleftarrows RE$;
Wirkungsbestimmend: (RA)

Seite

γ) Das Reaktionsschema 113
$R + A \rightleftharpoons RA$, $R + E \rightleftharpoons RE$, $RE + E \rightleftharpoons RE_2$
δ) Verschieden empfindliche Rezeptoren 113
8. Zusammenfassung zu Abschnitt II 116

D. Der Vergleich zwischen chemischer und biologischer Bestimmung 118
1. Die Anforderungen 118
2. Die Spezifität 119
3. Die Empfindlichkeit 121
a) Wasserunlösliche Gruppe 121
b) Wasserlösliche Gruppe 122
4. Die Genauigkeit 122
5. Der experimentelle Aufwand 123
6. Schlußfolgerungen 124
E. Zusammenfassung 126
F. Literaturverzeichnis 129

Zusammenfassung

Da für die Wirksamkeitsbestimmung eines Mutterkornalkaloidgemisches auf Grund chemischer Methoden eine quantitative Auftrennung in die einzelnen Alkaloide notwendig ist, wurden im chemischen Teil dieser Arbeit vorwiegend die papierchromatographischen Trennungsmöglichkeiten für diese Alkaloidgruppe bearbeitet.

Als erstes wurden die wichtigsten papierchromatographischen Methoden der Literatur für die Mutterkornalkaloide hinsichtlich ihrer Trennungsmöglichkeiten untersucht. Dabei ergab sich, daß eine saubere Trennung der Ergotaminin- von der Ergotoxingruppe mit keiner dieser Methoden erreicht wird, daß aber andererseits mittels der Methode von **Stoll** und **Rüegger** (Helv. Chim. Acta **37,** 1725, 1954) eine gute Trennung innerhalb der einzelnen Gruppen (erstens Ergobasin-Ergobasiningruppe, zweitens Ergotamin- und Ergotaminingruppe, drittens Ergotoxin- und Ergotininingruppe) möglich ist.

Aus weiteren Versuchen resultierte der Befund, daß die angestrebte Trennung der Ergotaminin- von der Ergotoxingruppe pH-abhängig ist und durch saure pH-Werte begünstigt wird. Ausgehend von dieser Trennmöglichkeit suchten wir mit dem Ziel, unter Verwendung der Methode **Stoll-Rüegger** in der 2. Dimension alle wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide in einem zweidimensionalen Papierchromatogramm zu trennen, nach einem geeigneten Phasenpaar für die Chromatographie in der 1. Dimension. Die Wahl des Phasenpaars für die 1. Dimension mußte so erfolgen, daß ohne energisches Trocknen, welches die Alkaloide zerstören könnte, die Chromatographie nach **Stoll-Rüegger** (mobile Phase: Formamid-Wasser; stabile Phase: Phthalsäuredimethylester) in der 2. Dimension angeschlossen werden konnte. Es ergaben sich dazu folgende Möglichkeiten:

a) mobile und stabile Phase in der 1. Dimension leichtflüchtig;

b) mobile Phase in der 1. Dimension leichtflüchtig;
stabile Phase in der 1. und 2. Dimension: Phthalsäuredimethylester;

c) mobile Phase in der 1. Dimension leichtflüchtig;
stabile Phase in der 1. Dimension: Formamid;
2. Dimension: Methode **Stoll-Rüegger** unter Umkehr der Phasen.

Einzig die Versuche mit leichtflüchtiger mobiler und stabiler Phase in der 1. Dimension (Möglichkeit a) führten zum Ziel: als geeignete Lösungsmittelkombination, welche den Anforderungen hinsichtlich Trennwirkung entspricht, und welche eine nachfolgende Chromatographie nach **Stoll-Rüegger** nicht stört, erwies sich Ameisensäure als stabile und Chloroform als mobile Phase.

Die dadurch ermöglichte zweidimensionale papierchromatographische Trennung der Mutterkornalkaloide erlaubt eine gute qualitative Charakterisierung eines Gemisches, ist aber für quantitative Zwecke noch unbefriedigend.

Bei der Auftrennung eines Secale-Extraktes traten Flecke auf, welche die Existenz eines bisher unbekannten Alkaloidpaares wahrscheinlich machen. Dessen R_f-Werte lassen vermuten, daß es sich um das Valin-haltige Paar in der Ergotamin-Ergotaminingruppe handelt, welches dem Paar Ergocornin-Ergocorninin in der Ergotoxin-Ergotiningruppe entspricht.

Im biologischen Teil wurde eine Methode zur Bestimmung der Uteruswirksamkeit entwickelt, welche das isolierte Corpus uteri von infantilen Meerschweinchen als Testobjekt verwendet. Das Testorgan wird vor der Benützung während 24 Stunden in Tyrode-Lösung von 3 °C aufbewahrt. Unter Registrierung der Längenänderungen werden bei einer Badtemperatur von 45 °C für jede Organhälfte ganze Dosiswirkungskurven von Test und Standard im Kreuzversuch aufgenommen.

Die Methode erlaubt eine selektive Bestimmung der biologisch wirksamen wasserlöslichen Mutterkornalkaloide. Die Bestimmung wird durch die wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide nicht gestört, indem diese unter den beschriebenen Bedingungen praktisch unwirksam sind und auch die Wirkung der wasserlöslichen Alkaloide nicht merklich beeinflussen; dagegen eignet sich die Methode nicht ohne weiteres bei Anwesenheit von Histamin, Tyramin oder Acetylcholin. Der mittlere Fehler ergab sich zu 26 %.

Ferner wurde eine Methode zur Bestimmung der sympatholytischen Wirksamkeit an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens ausgebaut, bei welcher verschieden wirksame Dosen von Test und Standard direkt verglichen werden können. Sie beruht auf dem Prinzip, daß aus dem Abstand zweier semilogarithmischer Dosiswirkungskurven des Adrenalins (Wirkung in Abhängigkeit vom Logarithmus der Adrenalinkonzentration) mit und ohne Testsubstanz (Test) bzw. mit und ohne Ergotamin in bekannter Konzentration (Standard) das Wirksamkeitsverhältnis von Test und Standard bestimmt wird.

Die Methode gestattet, vergleichende Wirksamkeitsbestimmungen im Kreuzversuch durchzuführen, deren Genauigkeit etwas vom Wirksamkeitsverhältnis zwischen Test und Standard abhängt. Bei einem Wirksamkeitsverhältnis von 3 betrug der mittlere Fehler 30 %, für das Wirksamkeitsverhältnis 1 dagegen 13 %. Da die Resultate nicht den Forderungen einer einfachen Verdrängungstheorie entsprechen, mußte bei Wirksamkeitsverhältnissen, die von 1 abweichen, ein empirischer Faktor zur Berechnung herangezogen werden.

Die Untersuchungen haben weiter ergeben, daß der Antagonismus Adrenalin-Ergotamin an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens zwar mit aller Wahrscheinlichkeit kompetitiv ist, daß aber die Beobachtungen von den Folgerungen der einfachen Verdrängungskinetik (zum Beispiel **Wilbrandt,** Helv. Physiol. Acta **8,** 399, 1950) quantitativ deutlich abweichen. Es zeigte sich nämlich, daß sich die Adrenalin-Dosiswirkungskurven bei Anwesenheit von Hemmstoff zwar wie erwartet

seitlich verschieben, daß dagegen diese Verschiebung nicht entsprechend der Theorie streng parallel erfolgt, indem das Mittelstück der semilogarithmischen Adrenalin-Dosiswirkungskurve unter Ergotaminwirkung stets steiler verläuft als bei Abwesenheit von Ergotamin. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die seitliche Verschiebung der Adrenalin-Dosiswirkungskurve mit steigenden Ergotaminkonzentrationen weniger stark zunimmt, als die Theorie erwarten läßt. Deutungsversuche für diese Abweichungen werden diskutiert.

Die chemischen und biologischen Bestimmungsmöglichkeiten für die Mutterkornalkaloide werden im Hinblick auf ihre Brauchbarkeit für die Arzneimittelkontrolle miteinander verglichen: wenn auch jetzt die chemische Bestimmung einen Stand erreicht hat, welcher sie der biologischen ebenbürtig werden läßt, so dürfte es doch heute, was die praktischen Bedürfnisse der routinemäßigen Arzneimittelkontrolle anbetrifft, noch zweckmäßiger sein, die Wirksamkeit der Präparate auf biologischem Wege nachzuprüfen.

Curriculum vitae

Ich wurde am 30. September 1927 in Bern geboren, wo ich die Primar- und Mittelschule besuchte und 1946 das Maturitätsexamen bestand. Anschließend studierte ich an der Universität Bern Medizin unter Absolvierung der 1. und 2. propädeutischen Prüfung für Ärzte. 1949 wandte ich mich dem Studium der Chemie zu und erwarb 1954 das Diplom eines Lizentiaten der Naturwissenschaften an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät in Bern. Seither arbeitete ich an meiner Dissertation.